

# LECTURES

## ウシガエル反転洞房標本を用いた心機能実験の改良 有用な生理学実習項目の存続へむけて

長崎国際大学薬学部教授 穎原 嗣尚  
同 学生 八頭司正稔

### 要 旨

伝統的な生理学実習項目の一つである「ウシガエル反転洞房標本を用いた心機能実験」に改良を加えた。この実験は、フランク・スターリング機構の理解や、イオンや薬物の心臓作用の観察のために大変有用である。薬物効果観察の新しい例として、細胞外 ATP の心臓作用の記録を供覧する。

### I. はじめに

この実験の基本的な部分は林ら [1-3] の功績によって確立されたものである。筆者の一人は10数年この実験を学生実習に取り入れ、その間いくつかの工夫を重ねてきた。すなわち、できるだけ汎用の機械・器具を使うようにしたこと、実験操作の簡略化を図ったこと、心房拡張期容積の測定法や後負荷増加の影響の観察法を考案したこと、心臓に対する各種イオンや薬物の効果を定量的に観察するため灌流液交換を迅速に行えるようにしたことなどである。以下、筆者らが現在行っている学生実習実験を紹介する。

### II. 実験準備

#### II-A. 標本

大型のウシガエルを用いる。実験は長崎国際大学動物実験委員会の承認を受け、日本生理学会の動物実験指針に従って行った。反転洞房標本は、心臓から心室を除去して静脈洞と心房を残し、それを裏返して心内膜面が外に向くようにしたもので、長時間(1日以上)安定に自発活動を続けるので、心臓自動能および心筋収縮能の観察に適して

いる。作成方法、裏返す理由は成書 [3] に詳しいのでここでは省略する。手技は簡単ではない面もあるが慣れれば30-40分で標本が完成する。

#### II-B. 実験装置

実験装置は、心房の液拍出動態を気密空間内での圧力変化として捉えようとするものである。図1に基本的な実験装置全体の模式図を、図2に標本槽の詳細を示す。反転洞房標本では洞房に入る静脈はすべて結紮されており房室境界輪のみが開放されている。その房室境界輪にカニューレ先端を差し込み糸で結んで固定する。カニューレ内にリンガー液を入れて垂直に保持する。このとき標本の拍動に伴ってその液面が上下するのを観察できる。カニューレとして筆者らはディスポ注射筒(10または20ml用)の外筒を用いている。その先端に長さ2mmほどにカットした細いチューブをかぶせておくと標本緊縛に都合よい。標本のついたカニューレを、スタンドに装着した小型両開クランプに固定した後、リンガー液の入った標本槽(ビーカー、詳細は後述)に浸す。標本槽はラボジャッキの上に置かれているので、そのノブを回すことにより標本槽の高さを自由に調節できる。

上に述べたカニューレ内液面の上下は心房の液拍出を反映している。この心房拍出を圧変化としてとらえるシステムについて説明する。カニューレの蓋に用いるシリコン栓(2または5号)に穴をあけてチューブをつなぎ、チューブの他端を緩衝ビンに、さらに圧力センサーにつなぐ。緩衝ビンとしては200ml用の三角フラスコが適当であり、これに穴をあけたシリコン栓(6号)をつけ、穴に

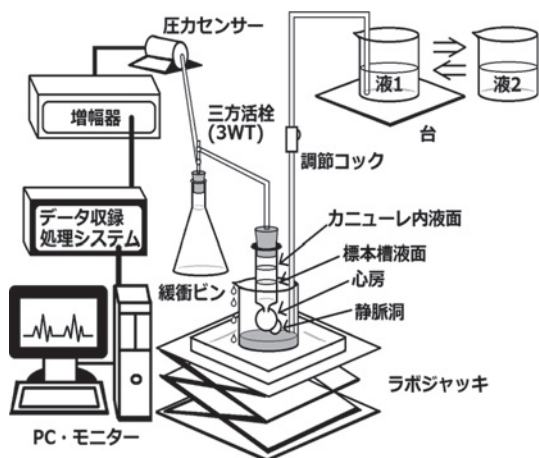


図1. 基本的な実験装置の模式図。ペンレコーダーは省略。実験目的に応じて付加する器具（小型緩衝ビンおよび空気注入用注射筒）は描かれていない（図5参照）。右上に示す外液灌漑装置は必ずしも必要ではない。そのほか詳細は本文に記載。

は3方活栓（医療用，ニプロ，3WTと略す）を複数連結したものを差し込む（図5参照）。そしてこの3WT群を介して図1に示すようなチュービングシステムを構築する。シリコン栓でカニューレに蓋をし，3WTを操作してチュービングシステム内空間を気密にすれば，標本の拍動にもなってシステム内の気圧が上下する。

圧力センサーとしては，医療用ディスポ血压トランスデューサー（DX-360，日本ベクトン・ディッキンソン製，日本光電販売）が安価で使いやすい。このトランスデューサーキットにはロック付きチューブなどを含むチューブセットが付属しているので，それらを上記チュービングシステムに利用できる。増幅器として筆者らが使っているのは日本光電製の圧力用アンプ（AP-610JまたはAP-621G）である。アンプ出力をペンレコーダーにつなげば記録装置の完成である。アンプは最大感度で使用し，その出力はDX-360との組み合わせにおいて100mV/0.4mmHgである。注意点を述べると，上記血压トランスデューサーは本来液圧測定用であるためか，気圧測定ではセンサー部分でわずかながら空気漏れを生じて記録にドリフトを起こすことがある。これを防ぐためにはセ

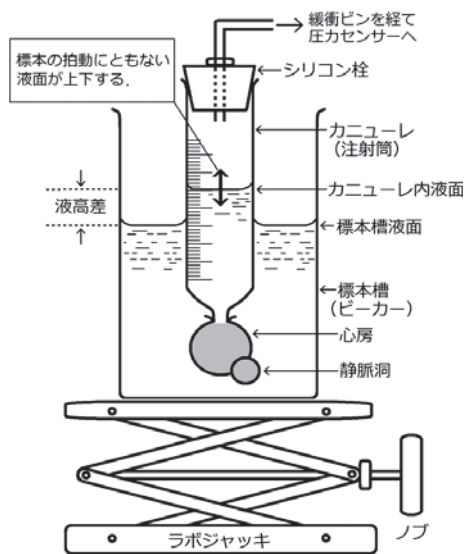


図2. 反転心房標本の拍出圧を検出する装置。図示されていないが，カニューレはスタンドに装着した小型クランプではさんで固定する。ラボジャッキを上下させることにより液高差を調整できる。

ンサー部分に少量の水を注入しておくといよい。

ペンレコーダーの使用でこの実習の目的は十分に達成できる。もちろん，データ収録・処理装置とPCのセットを用いれば大変便利である。筆者らはPowerLab system（ADInstruments, Australia）を組み入れ（図1），標本の圧出力，圧出力振幅および心拍頻度をreal timeでモニター上に観察するとともに（たとえば図10A），データを収録・保存して解析・作図に役立てている。

標本槽について述べる。とくに必要が無い限り標本槽は普通の50ないし100mlビーカーで十分である。外液の電解質組成を変える実験では，連続記録は取れないが正常液のビーカーと試験液ビーカーを入れ替えればよい。薬物の効果をみる実験では，やや精密さを欠くが少量の高濃度薬液をビーカー内に注入する（図9）。

実験をもっと精密に定量的に行うためには工夫が必要である。筆者らは30ml用ビーカーの底にシリコンゴムを充填して上縁までの全容量を約30mlにしたものを標本槽にし，さらに外液流入路を持たせている（図1の右上）。標本槽内液を他の

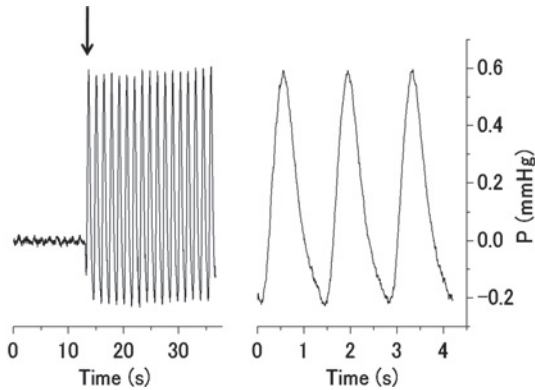


図3. 心房拍出圧 (P) の測定. 左は遅いチャート記録. 右は速い記録. 矢印の時点で心房最大拡張期に合わせて3WTを閉鎖した. 液高差, 1cm.

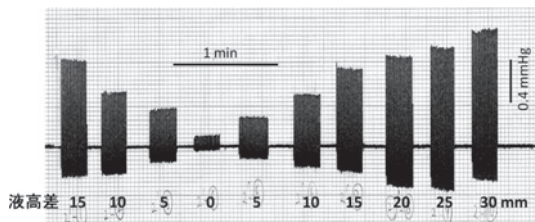


図4. 液高差の増減にともなう拍出圧変化の連続記録. 記録中, 3WTを開放してラボジャッキ操作により液高差を変え, ふたたび3WTを閉鎖するという操作を繰り返している.

試験液に変えるときは, 標本槽より約50cm高い台に試験液入りのビーカーを置き, その液100mlをチューブをとおして高速(約1.7ml/s)で標本槽に流す. 標本槽からあふれる液はそのまま捨てる(図1, 実験例は図10). もちろん対照記録のときも外液をビーカー上縁まで満たす.

### III. 基本的な実験操作

カニューレ内液面と標本槽液面の高さの差を液高差と呼ぶ(図2). 液高差は心房拍出量に重大な影響を及ぼすので, 実験中は液高差を頻繁にチェックする必要がある. とくに液漏れを否定できない標本では液高差が徐々に減少していくので, 適切にラボジャッキを操作して液高差を保持する. 液高差はカニューレ(注射筒)の目盛を利

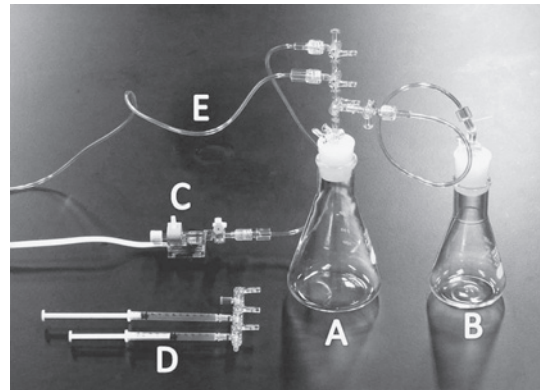


図5. 実験器具(一部)の写真. A, 通常の緩衝ビン(ビン1, 250ml用三角フラスコ). B, 小型緩衝ビン(ビン2, 100ml用三角フラスコ). Aに連結された状態で撮影. C, 圧力センサー. D, 空気注入用注射筒セット. A上部の3WTに接続して用いる. E, 標本カニューレにつながるチューブ.

用して読み取る. 10ml注射筒の場合, その最小目盛幅はほぼ1mmである. 外液組成変化や薬物の効果を観察するときの液高差は1cm程度が適当である.

拍出圧を記録していないときは3WTを開放しておき, 記録するときに3WTを閉める(図3). その閉めるタイミングであるが, 標本を見ながら心房が最大に拡張したときに合わせて3WTを閉鎖する. こうすることによって心房最大拡張期におけるシステム内気圧をつねに外気圧(記録上は0mmHg)に等しくすることができ, 記録を標準化できる. ただし拍出圧記録において, 心周期中の最低圧は外気圧より少し低く記録される(図3). これは心房最大拡張のあと静脈洞が拡張するためである. 緩衝ビン内温度が変化しないよう注意する. ビンに不用意に触れて温度が上がると内圧がそれに敏感に反応する.

### IV. 実験

#### IV-A. フランク・スターリング機構の観察

ラボジャッキを操作して液高差を0~数cmの範囲で変化させて拍出圧を記録する. ラボジャッキ操作は3WT開放中に行う. 液高差は標本に対する前負荷に相当するのであるが, この実験で前

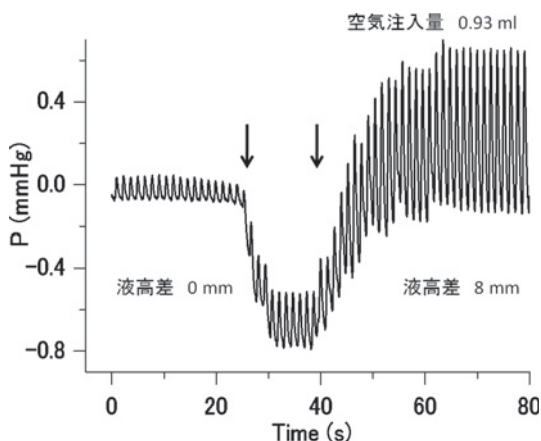


図6. 心房拡張期容積の測定例. ここでは液高差0でスタートし, 3WTを閉鎖したまま最初の矢印の時点でラボジャッキを下げ始め液高差を約1cmまで増やした. 次の矢印の時点でシステム内に空気を注入し始め, 下がっていた気圧レベル(心周期中の最低圧レベル)を元に戻した. 戻すに必要な注入量は0.93ml, 最終的な液高差は8mmであった.

負荷と拍出圧(拍出量)との関係を観察できる. 繰り返しになるが, 3WTを閉鎖するタイミングをつねに心房最大拡張期に合わせることが重要である. 図4に記録例(学生が得たもの)を示す.

拍出量は次の関係式から計算できる. システム内全空気容量を  $V$  ml とし, 拍出圧を  $p$  mmHg, 拍出量を  $s$  ml とすると,

$$760 \times V = (760 + p) \times (V - s) \quad (1)$$

であり,  $V$  は緩衝ビンに200ml用三角フラスコを用いた場合270mlである.

#### IV-B. 液高差と心房拡張期容積の関係の検討

3WTを閉鎖したままラボジャッキを下げて液高差を増加させると, システム内気圧が下がる. これは, 液高差増加(静水圧増加)によりカニューレ内液が心房内に移動(心房拡張)するためである. つぎに空気を外部からシステム内に注入して気圧を元に戻すことができるが, 元に戻すに必要な空気量は心房の拡張量に相当する.

実際の実験では, 空気注入のため1ml注射筒を2, 3本並列に連結した3WT群(図5)を作成して緩衝ビン上部の3WTに接続しておく. 上記操作による圧低下後, 注射筒操作により圧レベルを元

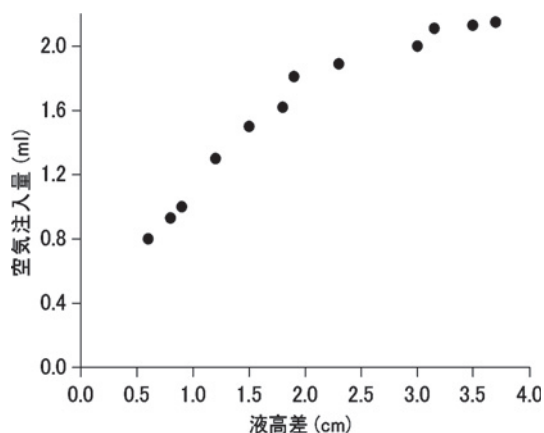


図7. 図6に示すような実験から得られた液高差と空気注入量(心房最大拡張期容積)の関係. 単一標本からのデータ.

に戻すことができれば, そのときの空気注入量と最終的な液高差を読み取る. 図6に測定例を示す. 図7はある標本から得られた種々液高差と空気注入量(心房拡張期容積)の関係である. 液高差増加により心房が拡張することを確認でき, これが拍出圧増加(図4)をもたらすことを理解できる.

#### IV-C. 緩衝ビン容量減少の拍出圧, 拍出量に及ぼす影響の検討

システム内空気容量が減少すると心房拍出に対する抵抗(後負荷)が増えるが, これが拍出圧と拍出量にどう影響するかを観察する. 新しく100ml用三角フラスコを用いた緩衝ビン(ビン2)を用意し, これを元の緩衝ビン(ビン1)系に接続して, 3WT操作でビン1, 2を瞬時に切り替えられるようにしておく(図5). ビン2を用いた場合, システム内全空気容量は150mlとなる. 標準液高差のもとで拍出圧を記録しながら, 心房最大拡張期に合わせて緩衝ビンを切り替えてみる.

図8に実験例を示す. 明らかにビン2において拍出圧が増加しており, これは気体力学的に説明できそうである. しかし, ビン1系, ビン2系の全空気容量がそれぞれ270mlと150mlであることを考慮して式(1)にならってそれぞれ拍出量を計算すると, ビン2系において拍出量が減少していることを確認できる. つまり, 拍出抵抗が増加



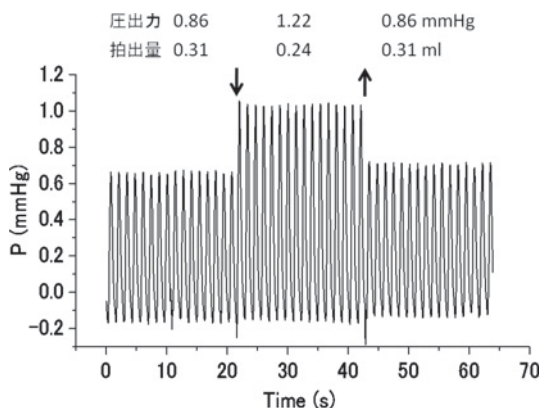


図8. システム内空気容量減少の拍出圧 (P) に及ぼす影響. 拍出圧を記録中, 最初の矢印の時点で心房最大拡張期に合わせて緩衝ビンを図5に示すビン1からビン2に切り替え, 次の矢印で元に戻した. 拍出量を式(1)により計算すると, ビン1で0.31ml, ビン2で0.24mlであった. 液高差, 1cm.

したとき拍出圧は増加するが拍出量は逆に減少する. これは心臓の力学的特性による.

生体において総血管抵抗が増加したとき血圧が上昇するが, 心拍量はそのままでは(前負荷が増えたり心肥大が起こったりしない限り)減少するのであり, 上記実験結果はこの循環病態生理学を念頭に置いて考察・討論できる.

#### IV-D. 温度の影響

水冷リングを準備する. それを標本槽に入れて測定を開始し, リンガー液温がほぼ室温になるまで測定を続ける. 低温での収縮力増加と拍動数減少を観察できる.

#### IV-E. 外液中の各種イオンの影響

筆者らは次の6種類の変調リングー液の効果を観察させている.

- 1 無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー
- 2 高  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー 4mM  $\text{Ca}^{2+}$
- 3 低  $\text{Na}^{+}$  リンガー NaCl 濃度 1/3, 蔗糖添加
- 4 無  $\text{K}^{+}$  リンガー
- 5 高  $\text{K}^{+}$  リンガー 1 10mM  $\text{K}^{+}$
- 6 高  $\text{K}^{+}$  リンガー 2 20mM  $\text{K}^{+}$

#### IV-F. 各種薬物の影響

Acetylcholine ( $10^{-5}\text{M}$ ), atropine ( $3 \times 10^{-4}\text{M}$ ),

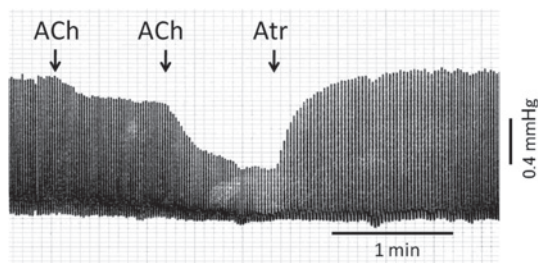


図9. 拍出圧に及ぼす acetylcholine (ACh) と atropine (Atr) の効果. 拍出圧を記録しながら最初の矢印の時点で ACh 原液 ( $10^{-5}\text{M}$ ) 0.1ml を標本槽 (50ml) に添加した. 次の矢印で同量再添加. そのあと Atr 原液 ( $3 \times 10^{-4}\text{M}$ ) 0.1ml を加えた. 液高差, 1cm.

adrenaline ( $10^{-4}\text{M}$ ), propranolol ( $10^{-3}\text{M}$ ) の薬物原液を用意し, これらの 0.1~0.3ml を標本槽リングーに注入することにより, agonist の作用とそれに対する antagonist の効果を観察する. 図9に記録例(学生が得たもの)を示す.

実験装置の項で述べた急速外液交換法を用いると, 薬物濃度を精密にコントロールできるとともに薬物効果観察の時間分解能を飛躍的に向上させられる. この方法はもちろん上記の外液イオンや薬物の効果の観察にも使える. 以下は学生実習のレベルを超えられると思われるが, この実験システムで何ができるか, 一つの例として細胞外 ATP の心臓作用観察について紹介する.

図10に  $30\mu\text{M}$  ATP の標準的な作用を示す. ATP は拍出圧を2相性に増強することが観察される. 拍出圧は ATP 作用後急速に増加しおよそ 30s でピーク (PK1) に達しその後減少する. 続いて再び増加して ATP 後約 90s で第2のピーク (PK2) を形成した後ゆっくりと減少する. 心拍頻度 (HR) も2相性の変化を示す. HR は PK1 の時相に一致して一過性に減少し最低値 (Rmin) に達した後増加する.

この ATP の複雑な心臓作用の機序を説明するため, 筆者らは PK1, PK2, Rmin など各パラメーターの ATP 濃度依存性の解析, 他のプリン体の作用の検討, 作動している受容体を知るための薬理学的実験などを行っている. 詳細を述べること

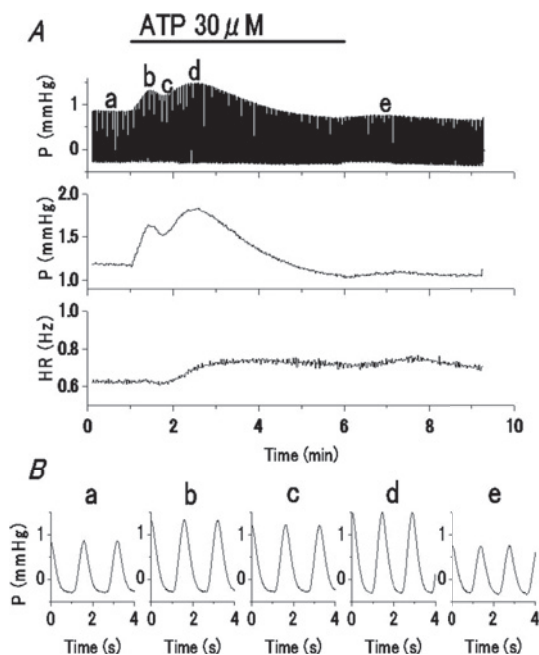


図10. 急速外液交換法を用いて観察したATP (30 $\mu$ M)の心拍動に及ぼす効果。A, 拍出圧(上段), 圧変化の振幅(中段), 心拍頻度(HR)のチャート記録。最上部横線の時間にATPを作用させた。B, A上段のa-eに対応する部分の拡大記録。液高差, 1cm。

はこの稿の目的にそぐわないので省略するが、観察された現象(図10)が、既知の、これまで組織切片・細胞標本で得られてきたATPの電気生理学的作用(文献は[4]参照)で説明できるかどうか興味深いところである。

## V. おわりに

反転洞房標本の実験は、林ら[1-3]によってその原型が確立された心臓に関する学生実習の標準

的題目の一つである。今回筆者らは実験方法に改良を加えるとともに、心房拡張期容積の簡便な測定、拍出抵抗増加の拍出量に対する影響の観察などの新項目を加えて、より包括的な実習実験にした。

実験準備、実験操作法については詳細かつ具体的に記述するよう努めた。この実習を準備・実施する際に参考になれば幸いである。反面、データのとめ方や学生が実験結果について吟味・考察すべき項目については省略した。いずれにせよ考察の要点は、観察された現象を器官、細胞、分子レベルで説明してみること、その生理的・病態生理的意義を考えることであろう。

この実習は心臓の生理学を理解するために大変有用であると筆者らは信じている。学生実習において動物実験が敬遠されつつある現況[5]の中で、ぜひいつまでも残しておきたい実習項目である。なにより、透明な標本槽の中でリズムカルに躍動する薄ピンク色の心臓を目にしたときに学生が見せる感嘆と驚きの表情は、標本作製などの苦勞を一気に忘れさせてくれるのである。

## 文 献

1. 林 秀生, 堀内 暎子: 翻転洞房標本: 心筋活動電位と収縮研究のための新方法. 医学と生物学 **83**: 245-250, 1971
2. 林 秀生: 医用電子・生体工学実験法. [II] 動物編, コロナ社, 東京, pp 254-264, 1976
3. 林 秀生: 生理学実習書, 改訂第2版. 日本生理学会編. 南江堂, 東京, pp 31-38, 1983
4. Matsuura H & Ehara T: Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells. *Circ Res* **70**: 851-855, 1992
5. 生理学実習アンケート調査結果報告. 日本生理学会教育委員会編. 日生誌 **71**: 266-268, 2009